

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03105

研究課題名（和文）子宮腺を有する子宮内膜組織の体外構築とそれを用いたウシ伸長胚発生分化機構の解明

研究課題名（英文）In vitro construction of bovine endometrium including uterine glands and the study on the mechanisms of bovine conceptus development

研究代表者

木村 康二（Kimura, Koji）

岡山大学・環境生命科学学域・教授

研究者番号：50355070

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：ウシ子宮内膜より子宮腺を単離し、成長因子存在下のマトリゲル内にて培養を行った結果、腺は伸長し、体内と類似した形状を示したが、細胞の重層化が見られた。マトリゲルに型コラーゲンを添加すると、腺の伸長は促進されたが、細胞の重層化には変化が見られず、また分泌タンパク質の遺伝子発現においても体内の子宮腺とは異なった。ウシ子宮腺の体外構築には更なる研究が必要である。一方、生後直後の子牛にプロゲステロンを投与したところ、一部のウシでその生殖能力（発情発現等）は正常であるが、子宮腺の存在が確認出来ない個体の作出に成功し、今後の子宮腺機能の解明に貢献すると期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胚移植において胚は子宮に移植されてからすぐに死滅すると考えられており、子宮内膜の機能がウシ胚の生存に大きく影響する。ウシ胚は子宮腺から分泌される様々な物質により成長するため、子宮腺機能の解明は胚の生存、ひいては受胎率向上技術開発にとって重要な研究課題である。本研究では低受胎要因解明のため体内と同じ機能を有する体外ウシ子宮腺の構築を試みた。その結果、まだ不完全ではあるがかなり体内のものと同様構造の形成に成功した。さらに生後すぐにプロゲステロンを投与することによって子宮腺欠損個体の作出にも成功しており、これらの成果は子宮腺機能の解明ひいては受胎率向上技術の開発に貢献する。

研究成果の概要（英文）：We isolated uterine glands from bovine endometrium and cultured them in Matrigel supplemented with a growth factor. The glands exhibited elongation and demonstrated a morphology similar to those found in vivo, but cell stratification was observed. Addition of Type I collagen to the Matrigel promoted gland elongation, but no changes were observed in cell stratification, and the gene expression of secretory proteins differed from those of uterine glands in vivo. Further research is needed for the improvement in vitro construction of bovine uterine glands. On the other hand, administration of progesterone to newborn calves immediately after birth resulted in successful generation of uterine knockout cattle. This achievement holds potential for contributing to the future elucidation of uterine gland function.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：ウシ 受胎率 子宮 子宮腺

1. 研究の開始当初の背景

ウシ胚はマウスやヒトと異なり透明帯脱出後子宮内膜に着床せず、しばらくの間（発情後 30 日前後まで）子宮内腔で成長を続ける。この間胚は球形から紐状へ、その大きさも数センチに達し、形態学的に大きな変貌を遂げる。このウシ特有の発生機構についての詳細は定かでない。ヒツジやウシ、マウス等において、出生直後の子宮内膜には子宮腺は存在せず、その後急速に形成・発達する。子宮腺は子宮内膜内腔上皮が子宮内膜間質層内に陥入することによって形成されるが（上皮性管腔形成）、その際、プロジェステロンの感作を受けるとその形成は阻害されることが報告されており、この現象を用いて人為的に子宮腺欠損個体（UGKO）の作出が可能となっている。この UGKO ヒツジにおいて、胚の成長は著しく阻害され、不妊となるとされており、正常な胚の発育・伸長・着床には子宮腺からの分泌物が必須である。一方、ヒトやマウスにおいて、体外で 3 次元子宮内膜構築が報告されている。しかしながら子宮腺を有するモデルではなく、ウシ伸長胚の発生・分化メカニズムを解明するためには、より生体に近い体外子宮内膜モデルの作出が必須である。

2. 研究の目的

ヒトやマウスでは着床や子宮内膜症の研究ツールとして子宮内膜の体外での構築は検討されているが、それには内腔上皮細胞と間質細胞のみを使用しており子宮腺を含めたモデルは存在しない。一方、ウシにおいてはヒトやマウスでは見られない胚伸長現象があり、これには子宮腺の存在が必須であることから、正常な機能を有する子宮腺を含めた体外での子宮内膜の構築がウシ胚の発生分化研究には必須である。しかしながら正常機能を有する子宮腺の体外での構築の報告はなく、本課題では抜本的に子宮腺の管腔形成から研究を実施する。

3. 研究の方法

1. ウシ子宮腺の体外管腔形成に必要な条件の検討

1.1. ウシ子宮腺の単離

食肉センター由来のウシ子宮から子宮小丘間の子宮内膜間質層を採取した。採取した組織は数ミリ角に細切した後、コラゲナーゼによって消化し、子宮腺のみを採取した。

1.2. ウシ子宮腺の体外培養

単離子宮腺は 50% マトリゲルと混和した後、硬化させた。硬化したゲル上には培養液を添加した。培養液とマトリゲルには、WNT タンパク質および上皮成長因子（EGF）を添加した。また、Canonical WNT 経路および WNT 分泌阻害剤や、他の成長因子である FGF2 が子宮腺様構造の形成に与える影響について検討を行った。培養後には、子宮腺様構造の形成率を算出した。さらに、従来のマトリゲルに加え、1 型コラーゲンゲルを混合したゲルを作製し、子宮腺様構造の形成や形態に与える影響も検討した。

2. 子宮腺様構造のキャラクター評価

得られたシストおよび子宮腺様構造をホルマリンで固定し、免疫染色を行うことで組織のキャラクターを評価した。マーカーにはサイトケラチン、ビメンチン、Ki67, ZO-1, ファロイジンを用いた。また、採取した単離子宮腺、シストおよび子宮腺様構造のほか、性ステロイドホルモンであるエストロゲン (E2) やプロジェステロン (P4) に感作させた子宮腺様構造から RNA を抽出し、得られた cDNA について、子宮腺から分泌されるタンパク質である SERPINA14 および SPP1 の発現量を定量的 RT-PCR 法で評価した。

3. 子宮腺ノックアウト・ウシの作出とその評価

出生後 24 時間以内にプロジェステロン製剤を腔内に挿入し、出生後 21 日目まで留置した。また、出生後 14 日目に、P4 シートを左右の背側皮下に各 1 枚インプラントし、出生後 120 日目まで留置した。残りの 2 頭については、出生後、何の処置も施さなかった。プロジェステロン処置を施した 2 頭および無処置の 2 頭が正常に発情を回帰していることを確認した。黄体が存在する卵巣と同側の子宮角から、鉗子を用いて子宮内膜組織を 3 カ所採取した。採取した子宮内膜組織は、速やかに 10% 中性緩衝ホルマリン液に浸漬し、切片を作製後、HE 染色を行い子宮腺の有無を確認した。

4. 研究成果

1. ウシ子宮腺の体外管腔形成に必要な条件の検討

上記の方法で子宮腺を回収することができた (図 1)。マトリゲル内に包埋された子宮腺断片の多くは培養開始 3 日後にシストを形成した。形成したシストを一旦マトリゲルから採取し、再びマトリゲル内に包埋した。培養液およびマトリゲルには WNT タンパク質および EGF を添加しない区 (無処理区)、WNT タンパク質および EGF を全て添加した区 (WNT+EGF 区)、各 WNT および EGF を 1 種ずつ取り除いた区、EGF のみ添加した区を用意したところ、WNT+EGF 区および各 WNT を 1 種ずつ取り除いた区、EGF のみ添加した区では子宮腺様構造が形成されたが、無処理区および EGF のみを取り除いた区では子宮腺様構造は形成せず、ほとんどがシストを形成した (図 2)。タイムラプス顕微鏡を用いて経時的に解析を行った結果、再包埋したシストは、内腔を消失させて細胞塊を形成し、細胞塊はスパイラルを描くように回転しながら伸長・分岐することが確認された。また、伸長過程において、一時的に内腔を呈することが確認された。EGF の存在下で Canonical WNT 経路および WNT 分泌阻害剤を添加し、子宮腺様構造の形成に影響があるかどうかについて検討を行ったが、これら阻害剤の添加に



図 1：単離したウシ子宮腺

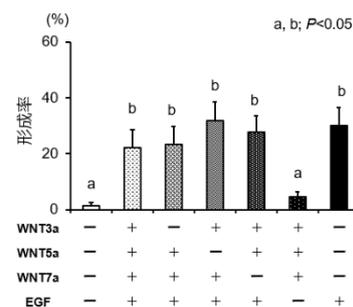


図 2：子宮腺様構造の形成率

より形成された子宮腺様構造の形成率は影響を受けなかった (図3).

以上より, シストから子宮腺様構造を形成させる際に EGF は必須であるが WNT タンパク質は必須でないことが示されたため, 単離子宮腺を直接マトリゲルに包埋し, EGF のみを添加して培養したところ, シストの形成は起こらず, 直接子宮腺断片から子宮腺様構造が形成することが明らかとなった (図4). これは EGF 受容体阻害剤によって抑制されることが示されたほか, 同じ成長因子である FGF2 を添加し培養しても子宮腺様構造は形成されなかったことから, EGF に特異的な現象であることが示された (図5).

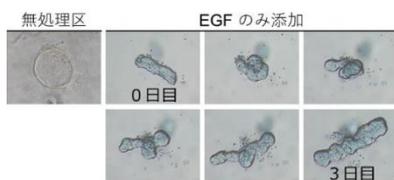


図4: EGFのみ存在下マトリゲル内で3次元培養した単離子宮腺の形態変化

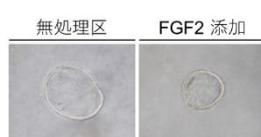


図5: FGF2存在下マトリゲル内で3次元培養した単離子宮腺の形態変化

子宮腺の採取した場所が子宮腺様構造の形成に影響するのか明らかにするために, 子宮内膜の浅部ならびに深部のそれぞれから子宮腺を単離し, WNT タンパク質ならびに EGF 存在下で培養したところ, 両者の間で子宮腺様構造形成率に差は認められなかった (図6).

単離した子宮腺断片をトリプシンで消化し, 細胞懸濁液とした後, マトリゲル上に播種して培養を行った. WNT タンパク質および EGF 存在下でシスト形成が見られたため, このシストをマトリゲル内に包埋し培養したところ, 先述のような子宮腺様構造の形成は見られず, シストのままであった.

マトリゲルと1型コラーゲンの混合ゲルで3次元培養した子宮腺は, マトリゲル単独ゲルと比較して, 子宮腺様構造の形成率に影響しなかったが, 有意に子宮腺様構造の伸長部分を長くさせた (図7). しかしながら, ゲルの違いに拠らず, 子宮腺様構造は Ki67 陽性細胞で構成されており, 陽性細胞の組織内での局在に変化は認められなかった (図8).

2. 子宮腺様構造の特徴

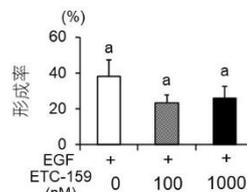
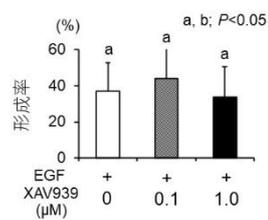


図3: Canonical WNT 経路および WNT 分泌阻害剤が子宮腺様構造の形成に与える影響

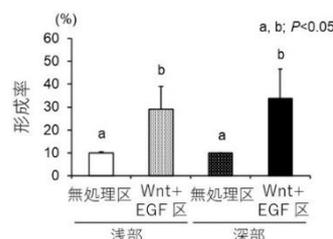


図6: 子宮内膜の部位の違いによる子宮腺様構造の形成率

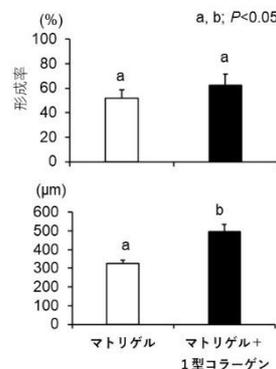


図7: 1型コラーゲンによる子宮腺様構造の伸長部分の長さの変化

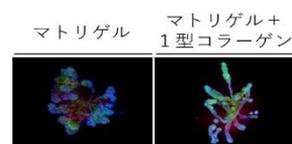


図8: 1型コラーゲンによる子宮腺様構造における増殖細胞の分布

得られたシストおよび子宮腺様構造をサイトケラチンとビメンチンで染色したところ、共にサイトケラチン陽性かつビメンチン陰性となり、腺様構造を形成する細胞は上皮系細胞で構成されることが明らか

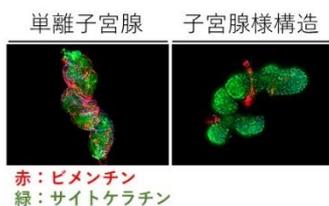


図9：子宮腺様構造における上皮系・間葉系マーカー発現

となった(図9)。子宮腺様構造には細胞の多層化・重層化が認められたが(図10, 赤矢印), 部分的な内腔の再形成が認められ, 伸長した重層化部分のうち, 内腔と接した細胞の細胞接着間では ZO-1 の局在が確認されたことから(図10, 白矢印), 子宮腺様構造では部分的に頂底極性が回復していることが示唆された。

単離子宮腺, シスト, 子宮腺様構造における分泌タンパク質(SERPINA14・SPP1)の遺伝子発現を比較したところ, SERPINA14 では, 単離子宮腺と比較してシストで発現が有意に増加した一方, 子宮腺様構造では単離子宮腺と比較して有意な差は認められなかった。SPP1 では, いずれの間にも有意な差は認められなかった(図11)。また, 子宮腺様構造を子宮内での胚の生育時期と同様の性ステロイドホルモン濃度で培養したところ, 無処理区と比較して分泌タンパク質(SERPINA14・SPP1)の遺伝子発現に変化が見られたものの有意な差は認められず, これまでに報告されている子宮内膜におけるこれらの遺伝子発現とは完全に一致していなかった(図12)。

3. 子宮腺ノックアウト・ウシの作出とその評価

無処置牛2頭およびプロジェステロン処置を施した牛のうち1頭の子宮内膜組織において子宮腺の構造が多数確認された一方, プロジェステロン処置を施した牛のうち1頭の子宮内膜組織には子宮腺が確認されなかった(図13)。

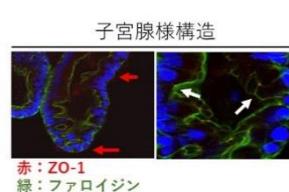


図10：子宮腺様構造における頂底極性の形成

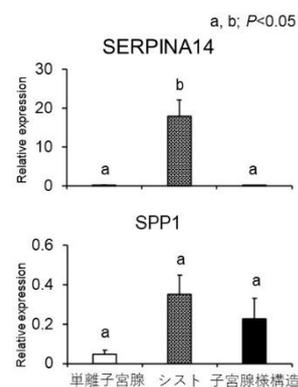


図11：分泌タンパク質の遺伝子発現解析

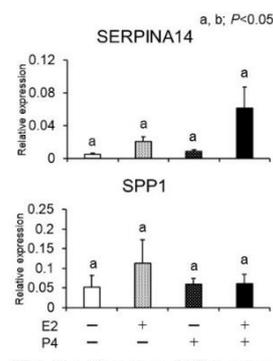


図12：性ステロイドホルモンが子宮腺様構造の分泌タンパク質発現に与える影響

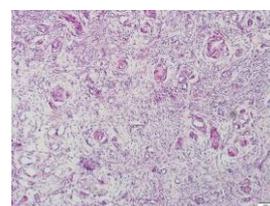


図13：生後プロジェステロン処理した牛子宮内膜組織

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 SUGINO Yosuke, SATO Taiki, YAMAMOTO Yuki, KIMURA Koji	4. 巻 68
2. 論文標題 Evaluation of bovine uterine gland functions in 2D and 3D culture system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 254 ~ 261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2022-029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shunsuke Sakai Toshimitsu Hatabu Yuki Yamamoto Koji Kimura	4. 巻 8
2. 論文標題 Alteration of chemokine production in bovine endometrial epithelial and stromal cells under heat stress conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e14640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.14640.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 杉野耀亮、佐藤太紀、藤原希、木村康二
2. 発表標題 上皮成長因子による3次元培養下でのウシ子宮腺の形態学的変化
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yosuke Sugino, Taiki Sato, Nozomi Fujiwara, Koji Kimura
2. 発表標題 EFFECTS OF THREE-DIMENSIONAL CULTURE ON BOVINE UTERINE GLANDS
3. 学会等名 THE 4th INTERNATIONAL CONFERENCE ON SUSTAINABLE AGRICULTURE AND ENVIRONMENT (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉野耀亮、佐藤太紀、山本ゆき、木村康二
2. 発表標題 ウシ子宮腺の体外構築に関わる因子を求めて
3. 学会等名 おかやまバイオアクティブ研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yosuke Sugino, Sayaka Ito, Yuki Yamamoto, Koji Kimura
2. 発表標題 Evaluation of 3D-culture system of bovine oviductal epithelial cells based on morphology of the cycts.
3. 学会等名 SSR 54th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉野耀亮、佐藤太紀、藤原 希、山本ゆき、木村康二
2. 発表標題 3次元培養におけるウシ子宮腺様構造の形成と関与する因子
3. 学会等名 第 44 回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yosuke Sugino, Taiki Sato, Nozomi Fujiwara, Yuki Yamamoto, Koji Kimura
2. 発表標題 Formation of bovine uterine gland like structure in in vivo 3D culture system.
3. 学会等名 International Symposium on Animal Bioscience (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉野耀亮、伊藤さやか、山本ゆき、木村康二
2. 発表標題 3次元培養したウシ卵管上皮細胞は生体組織とは異なる特有の性質を持つ
3. 学会等名 第 114 回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yosuke Sugino, Yuki Yamamoto, Koji Kimura
2. 発表標題 Attempt to establish of in vitro bovine oviductal epithelial cells model for ciliogenesis.
3. 学会等名 2nd International Conference on Animal Production for Food Sustainability (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤太紀、酒井駿介、山本ゆき、木村康二
2. 発表標題 体外での子宮腺構築を目指した子宮腺の2次元および3次元培養における胚成長関連遺伝子発現
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松山 秀一 (Matsuyama Shuichi) (50455317)	名古屋大学・生命農学研究科・准教授 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山本 ゆき (Yuki Yamamoto) (20645345)	岡山大学・環境生命科学研究科・准教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関